

## Production of poly-beta-hydroxybutyrate in transformed escherichia coli

Publication number: JP5507410T

Also published as:

Publication date: 1993-10-28

WO9118993 (A)

Inventor:

EP0535065 (A1)

Applicant:

US5334520 (A1)

Classification:

FI925333 (A)

- International: C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; (IPC1-7): C12N1/21; C12N15/52; C12P7/62; C12P7/62; C12R1/19

EP0535065 (A0)

- european: C12N15/52; C12P7/62A

Application number: JP19910510838T 19910520

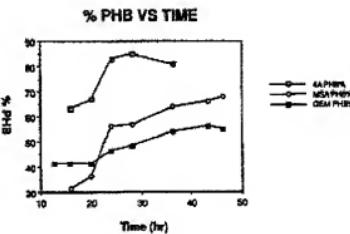
Priority number(s): WO1991US03547 19910520; US19900528549 19900525

[Report a data error](#) [Report a document error](#)

Abstract not available for JP5507410T

Abstract of corresponding document: US5334520

Methods are provided for enhancing the production of PHB from a transformed E. coli host which includes the genes coding for the PHB biosynthetic pathway. By inserting the genes coding for PHB into a host which includes a lactose utilization system, a low cost minimal medium including whey can be used as the fuel and carbon source for PHB production. A plasmid which codes for the PHB biosynthetic pathway plus four hundred extra bases on either side of the first and last genes in the pathway has been inserted into the host and has been shown to produce a larger amount of PHB accumulation in a shorter period of time than other plasmid constructs. CaCl<sub>2</sub> has been shown to be an effective agglomerating agent for agglomerating PHB which has been produced in a transformed E. coli host.



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

## ④公表特許公報(A)

平5-507410

④公表 平成5年(1993)10月26日

④Int.Cl. 5 C 12 N 1/21 15/52	識別記号 7236-4B 8931-4B	序内整理番号 7236-4B C 12 N 15/00	審査請求 未請求 子審査請求 有	部門(区分) 1 (1)
			A*	(全 7 頁)

## ④発明の名称 形質転換したエセリキヤ・コリにおけるポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸の改良生成

④特 願 平3-510838	④出願 平3(1991)5月20日	④拒文提出日 平4(1992)11月25日
		④国際出願 PCT/US91/03547
		④国際公開番号 WO91/18593
		④国際公開日 平3(1991)12月12日

優先権主張 ④1990年5月25日④米国(US)④528,549

④発明者 デニス、ダグラス・イー アメリカ合衆国22496バージニア州、ウェイヤーズ・ケイブ、ボックス92エヌ、ルート2番

④出願人 センター・フォー・イノベイテ アメリカ合衆国22070バージニア州、ハーヴィング、ロック・ヒル・ロード2214番、スイート600、スイアイティ・ビルディング

④代理人 弁理士 青山 葵 外2名

④指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), E, S(広域特許), F, I, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に統合

## 請求の範囲

このように私の発明を述べたように、私が折新なものとして請求し、特許紙により記載することを至むのは以下の通りである。

1. ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能をコードするデオキシリボ核酸を含むインベクターにより形質転換されたラクタース利用系を有するエセリキヤ・コリ細胞菌。

2. 该デオキシリボ核酸記載が、該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において、3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する最初の400ヌクレオシド塗基及び該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において該3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する第2の400ヌクレオシド塗基を含む請求項1のエセリキヤ・コリ細胞菌。

3. 以下のATCC登録番号53829を有する該項2つのエセリキヤ・コリ細胞菌。

4. 該細胞のエセリキヤ・コリ細胞HMS 174から剥離される該項1のエセリキヤ・コリ細胞菌。

5. 該インベクターがプラスミドT218Uである該項1のエセリキヤ・コリ細胞菌。

6. ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能をコードするデオキシリボ核酸記載が、該デオキシリボ核酸記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する最初の400ヌクレオシド塗基及び該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において該3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する第2の400ヌクレオシド塗基を含む請求項1のエセリキヤ・コリ細胞菌。

7. 该デオキシリボ核酸記載が、該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する最初の400ヌクレオシド塗基及び該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において該3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する第2の400ヌクレオシド塗基を含む請求項5のエセリキヤ・コリ細胞菌。

8. ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能をコードするデオキシリボ核酸記

到を含むインベクターにより形質転換されたエセリキヤ・コリ細胞菌であって、該エセリキヤ・コリ細胞菌は回復しうる量においてポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸を生成するため能動として最も高地を用いる能力を有する。

9. 該デオキシリボ核酸記載が、該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において、3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する最初の400ヌクレオシド塗基及び該ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能において該3つの連鎖子記載の産物の間の該デオキシリボ核酸記載に位置する第2の400ヌクレオシド塗基を含む請求項8のエセリキヤ・コリ細胞菌。

10. 該小高地及びホエイを含む形質転換されたエセリキヤ・コリ細胞は、ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸を生成するため能動であって、該形質転換されたエセリキヤ・コリ細胞はポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸生合成能を有し、ポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸の生成のため能動としてホエイを利用する能力を有する。

11. 該細小高地が能動地約20%であり、該ホエイが能動地約4.0%であり、そして水が能動地約4.0%である請求項10の地。

12. 0.5%ペーセントNaHPO<sub>4</sub>、  
0.3%ペーセントKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、  
0.1%ペーセント塩化アノニウム、  
0.05%ペーセント塩化ナトリウム、  
5.8.84%ペーセント水、  
0.012%ペーセント硫酸マグネシウム、  
0.0005%ペーセントアミン、  
0.013%ペーセントカゼイノ酸及び  
4.0%ペーセントホエイ。

を混合し、形質転換されたエセリキヤ・コリ細胞にポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸を生成するため能動地。

13. 以下の表現を含むポリ-β-ヒドロキシ脂肪酸の製法。

エセリキヤ・コリ細胞菌の培養を供給すること、各宿主はラクタース利用系



がなされた。複数されたP HBを大量に回収するため、形態を無されたイー、コリ菌は必ず機械または物理的手段、例えば物理的又は化学的手段により操作する。次いで細胞は、イオン導体、例えば100ミリモル(mM)硫酸カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)又はインシュベート・P HBを加える。通常に至まりは過度に増殖を防ぐために、実験は、培養液中のホルミド(100%)のP HBがこの方法により死滅し、回収されることを示す。結果は、同じ細胞がエイ、エトロスカからP HBを回収するには不可能であるので特に強調である。

#### 菌の簡単な説明

前述の及び他の目的、表面及び成分は、菌を用いて本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な記載からよりよく理解されるよう。図において、

図1は、P HB表面の最も大きなP・D複合物を含んでいる様子のイー、コリクローンへの時間軸を示す棒グラフである。

図2及び3は最も最小複合及びビニルを用いた形態を無されたイー、コリにより生成したP HBの着色を示す棒グラフである。

図3は、CaCl<sub>2</sub>を用いたP HB表面のバーセントを示す棒グラフである。

図4は、P HB表面がP HBが複数個のガラスの存在で覆い、次いで酸化アルミニウムに付された時間軸を示す棒グラフである。そして、

図5は、P HB面へのガラス牛乳及びカルシウムの対照的結果を示す棒グラフである。

背景実験のベストモード

菌は、より詳しくは図2を用いて、プラスミドp44を含んでいるイー、コリHMS174は、異なるプラスミド複合物を含んでいる他のイー、コリクローンHMS174は、異なるプラスミド複合物を含んでいる他のイー、コリ、コリHMS174はエイ、イー、コリ・スッタ、センタ、ペーパー、ペッターマン、スルピカから入手できる。p44プラスミドはP HB生成過程及びベクター→T-Z-18 U上P HB生成過程の上部及び下部側に約400の分の基質を

を有する。ベクター→T-Z-18 Uはユニティッド・スチツ、バイオケミカルズから入手できる。M5Aは、ベクター→T-Z-18 U上にP HB生成過程を及ぼす複数のプラスミドT-Z-18 UにマージpH174からのZ-末端遮断子を有する。M5Aは、それがP HB生成過程の上部に約400の分の基質を有することによってp44と異なる(即ちP HB生成過程はpT-Z-18 UにクロノされたPMS AJと呼ばれ)T-Z-18 U-P HBを作り、P44は、プラスミドベクターから入手できるベクター→GEM-T-Z上にP HB生成過程の上部側上のpT-Z-18 U-P HB 400より少ない基質である。

p44とT-Z-18 U-P HB(M5A)及びGEM-T-Z-P HB(M5)クローンは、全て、使用の分子クローニング技術を用いて引出し、組成された時間軸特異的及び競合的で複数個で構成されたP HB生成過程をもむ。コリクローンから構成された、特異出芽及び競合性で示されたように、P HB生成過程はエイ、エリオカルボンから分離し、イー、コリで死滅する。生合過程は約5秒の時間の差でZ-エンドをオーラゼ、NAD-P-結合アセチルカルニンジアミン(CoA)レダクターゼ及びP HBシンターゼをコードする遺伝子を含んでいる。即ちM5A及びGEMクローンがP44クローンはどのくP HBを生成しないことを示す。

イー、コリHMS174はそれがラクトース利用菌を含み、そしてそれは酸性を欠いてゐるのを主としている。酸性えん張は、ラクトース濃度部分を含んでいるプラスミドが組換えせず、複合物を不変にしないことを保証する。以下に述べるように、HMS174のラクトース利用菌の序列为より、ホエイ、その主成分がラクトースであるゲーズ製酸菌菌生産物はP HB生成の共通薬として用いられる。形態変換はれなイー、コリを含めていて、P HB生成過程アルカシ、ユニティッド・スチツ、バイオケミカルズ、ベクター→T-Z-18 UにクロノされたP HB生成過程の400基質上部及び下部であるプラスミドp44はイー、コリHMS174に電気泳動で示す。p44プラスミド含んでるイー、コリの株は、1990年5月23日に12801バーチャー、ドライバ、

ロックヴィル、MDのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、登録番号88629を有する。

p44プラスミドで形態変換したイー、コリのHMS174株がホエイを含んでいる最も小地域に当たることを示す実験が行なわれた。用いられた最も小地域はほとんどの微生物学的生産学テクストに記載されるP HB最小地域であった。表1はM9最も小地域の5X複合物の方程式を表示し、表示した成分の容積は1リットルプラスミドを、水は1リットルまで加える。

表1

5X M9最も小地域方程式

3.0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 g NH<sub>4</sub>Cl

2.5 g NaCl

ホエイは、シグマ・ケミカルズからウシホエイの粉末として販売、1.00 mlの最終量を有する水に2.0 gのホエイを溶解することにより作った。溶解は約30分間ゆるやかに加熱して行った。次いでこの溶解をオートレーブルにかけ、過熱の間沈殿した粒子を1分間10,000 rpmで遠心することによりペレットとした。残っている上清をホエイ溶液として用いた。

実験では、プラスミドp44を含んでいたHMS174イー、コリ株を平板培養から5.0 mlのM9最も小地域+ホエイ溶液に接種した。表2は、8.0%の最終濃度でホエイを含んでいた5.0 mlの最も小地域から細胞を表示する。

表2

P HB生成過程最も小地域+ホエイ

1.0 ml 5×M9地

2.0 ml 44H(2型酵母水)

5.0 ml 1MMG5a

5.0 ml 0.5%チアミン

#### 2.5 ml 2.0%カゼイン液

#### 2.0 ml 2.0%ホエイ培地

接種した初期は2.50 mlのM9最も小地域+Omnifloのラクスコロ30 rpmでオーバーラインシューペーパー-シュー-カーボ37°Cで48時間増殖生じた。48時間のインキュベーション後培養液、培養液を定めて細胞を漏めた。ガスクロマトグラフィーを用いてP HB含量を分析した。

表2及び3はそれぞれ、細胞の全重量で割った細胞当たりのP HB量として接種した細胞中に示されたP HBのバーセント及び最も小地域を有する培養液の異なるホエイに対し、p44でなした全P HBとして表された細胞中のP HBの収量を示す。即ち表2及び3は、非常に低濃度のホエイ、即ち濃度中2.0 mlで8.0%、高濃度のP HB収量(即ち9.0%より大)及び高濃度のP HB(即ち1.0 ml/ml)であることを示す。表2及び3で示す濃度のホエイを有する培養地がより大きな収量及び収量のP HBを生成する傾向があることを示す一方、ホエイ濃度が最も高濃度のP HB生成が下り始めることが認められた。

上の実験、P HB生成は4時間のインキュベーション後、細胞されたことに在りすべくである。加えて、5X最も小地域方程式のNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl及びNaClの比較濃度及び5X最も小地域、2型酵母水、MgSO<sub>4</sub>、チアミン、カルボン酸及びホエイ濃度を示すことができる。一方ラクトース利用菌を有する形質変換されたイー、コリ菌は、それらの細胞がここに示すラクトース利用菌を有しないので、酸性菌としてホエイを用いて生産できなかった。P HBは、その

ホエイが最も小地域に存在するP HBの生成に共通してホエイを用いることは、P HB生成にグルコースを用いる地域を用いて生産性の頂点を極めてからその資源地盤となることが明確される。P HB生成過程をコードしているプラスミドを有し、同時に微生物出芽及び競合性で示された生産技術の実験がなされたイー、コリ細胞は、それらの細胞がここに示すラクトース利用菌を

細胞もラクタース利用能に欠けるので、その供給源としてホエイを用い底産の増加、アラカリグリコス、エウトロフスに底産され等。加えてP HBに示されるように、特許などラズミドP HBで特許はイー、コリ生産形質を換えることは、イー、コリがP HB生産形質をもコロする異なるベクターで形質を換えた場合よりも高いペーセントでP HBを生成させる。

P HBはその寄生の寄生エイ、エウトロフスよりもラムイー、コリに生成されているので、出発人未形質換換されたイー、コリにより生成したP HBホリマーレイー、エウトロフスに生成したP HBとは異なる物理的性質を有する様である。寄生出願人は、形質換換されたイー、コリにより生成されたP HBと寄生のイオング溶液によって活性化できるかを判定するため実験を行なった。実験によって、P HBは、上記述された開発段階で出発及び形質換換文で候ったように形質換換されたイー、コリに生成した。實質に云うと、P HB-生成を1kgグルコースを含んでるアルブロソル(1L)中2時間37°Cで底産ラズミドP HBで生成する。相性を適心(2.0×2.5分)によりリバッジとし、次いで元の培地と等しい容量の水に再び懸濁する。細胞を次いで殺菌処理により殺菌し、殺菌のイオング溶液を処理に加えた。更には培養のイオング溶液による形質換換されたイー、コリに生成したP HBへの影響を示す。

表3

寄生のイオング溶液によるP HBの最高

用意	最高濃度%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	++
NaCl	+
CaCl <sub>2</sub>	-
MgSO <sub>4</sub>	+++
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+
MgCl <sub>2</sub>	++++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	+

CaCl<sub>2</sub>のより高まるP HBのペーセントに対するP HBのペーセントを決定するため実験がなされた。実験において、イー、コリのP HB-生成は1kg底産ラズミドP HBを含んでるアルブロソル、24時間37°Cで底産ラズミドP HBで生成した。細胞を適心(2.0×2.5分)によりリバッジとし、次いで元の培地に等しい容量の水に再び懸濁する。次いで底産を殺菌処理により殺菌し、次いで底産を1M硫酸カルムの50倍の濃度により10mMとした。質を1.0を底産でシッキベトし、次いで400×25分間を適心した。活性化したP HB粒子がベレット化し、一方多くの細胞核が上層液に陥った。次いで上層液を吸引した。ベレットと上層に吸引されるP HBの分離を示すためベレットと上層を硝酸ガスクロマトグラフィー又は授体シンセチレイン計数を用いて測定した。

図3は培養における後とんどて(100%)のP HBが上層液により活性化して図示されたことを示す。この実験でP HBの量はガス硝酸ガスクロマトグラフィーでのみ測定した。この実験はラズミドの寄生が底産の底産に影響するかどうかを測定するため後づかの硝酸ガスで行ない、全ての底産において、全てのP HBが活性化し、過心により更に活性化する傾向がわかった。

第4は増量は活性化に十分な底産を示せることが底産に必要であり、さもないと収率が低下することを示す。底産を1.0をMgCl<sub>2</sub>の存在下で1.0×10分インキュベーション時間とし、ベレット及び上層液フラクションを用いて2分間離心で分離した。第4は、CaCl<sub>2</sub>添加培養液の数段階は上層に存在するP HBの量はベレットにおけるものより底産に大なることを示す。しかししながら8分後(ベレット中で活性化されたP HBの量は、平らになり測定するベレットに於けるP HBの量は、上層液フラクションに於けるものよりずっと多い)この時点では、この実験は、その点と並んで1.0×10分の底産としてP HBに吸引された約80%に活性化されるが、その後からは増加傾向を示すが活性化底産1.4倍を測定することに達するのである。ほとんどてのP HBが活性化されても活性化底産活性化底産グルコースのために依然として上層に多くの種の細胞が存在

MgOAc	++++
NaOAc	++
KCl	-
KOAc	-
CaCl <sub>2</sub>	++++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-

\*全ての底産は1Mの底産濃度であった。\*\*図は各組合体のミクログラフを用いて主観的に格付けした。「+」は最も高いを示し、「++」は次高濃度の図を示す。「-」は取り得ないことを示す。

表3は幾つかのイオング溶液が形質換換されたイー、コリに生成したP HBを活性化することを示す。底産の活性化は図りの浓度及び大きさに関する主観的判定に基づきCaCl<sub>2</sub>であった。CaCl<sub>2</sub>の活性化は、その底産エイ、エウトロフスに生成したP HBを活性化しない(既に、P HB粒子は解離したアルブリゲム水素1.0×10分の底産上では、活性化はほとんど同時に起こる)。底産のフレクターカルシウムから活性化された後、カルシウムで処理して活性化が阻害されない現象がなされた。

実験はP HBを活性化するのに用いるCaCl<sub>2</sub>の理想的濃度を決定するためになした。實験において、形質換換されたイー、コリ細胞を殺菌し、上層にしなじように溶解した。次いで底産は、1M底産CaCl<sub>2</sub>濃度を用い異なるMgCl<sub>2</sub>濃度とした。低濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば1mMでは、P HB粒子を活性化するのに非常に長時間を要し、少しの活性化しか活性化しなかった。高濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば10.0mMの底産上では、活性化はほとんど同時に起こる。底産のフレクターカルシウムとなり、質の底に沈没した。しかしながら高濃度のCaCl<sub>2</sub>で活性化された質より大量的細胞核を有するよう見えた。次いで高濃度のCaCl<sub>2</sub>は活性化に至らしくない。中濃度のCaCl<sub>2</sub>、例えば5mMないし10.0mMを用いた場合、ベレットを作った場合の活性化が少ない5分の底産シッキベーチョンが起きた。活性化が底産の底度及び大きさの底で底産の活性化を生ずるために1.0mM CaCl<sub>2</sub>の使用が決定された。

する。

図5は、P HBの活性化を形質換成、例えばハイドロソルから入手できるガラスルクの底産により活性化が可能であることを示す。底産において、ベレット及び上層の分離の材料(CPMD)を含むし、「-ga+CaCl<sub>2</sub>」はガラスルク及び1.0mM CaCl<sub>2</sub>の存在でのP HB活性化を示し、「-ga-」はガラスルク及びCaCl<sub>2</sub>の存在でのP HB活性化を示し、「-ga+」はガラスルク及びCaCl<sub>2</sub>の存在でのP HB活性化を示す。図5から、複数底産の添加による活性化活性化は、それほど大きくなり、従って、大量の底産活性化ではこのような剤の使用によって大きな利益が与えられることはないと示す。

本実験は、大量のP HBを殺菌できる形質換換されたイー、コリ株を処理し、P HB-生成のため活性化底産活性化、例えばホエイを使用し、イオング溶液、例えばCaCl<sub>2</sub>がP HBを活性化するのに使用できるその特徴と活性化底産に於いて記載されたが、この実験の底産は未発明が原付された底産の特徴及び細胞内で活性化底産であることを示すものである。

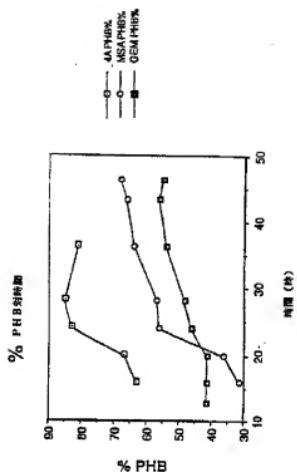


FIG. 1

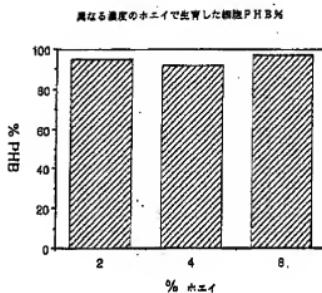


FIG. 2a

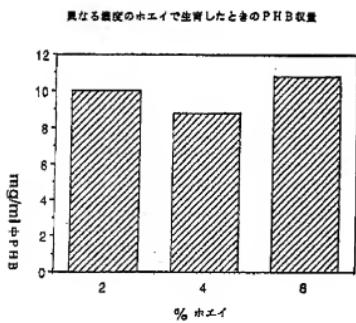


FIG. 2b

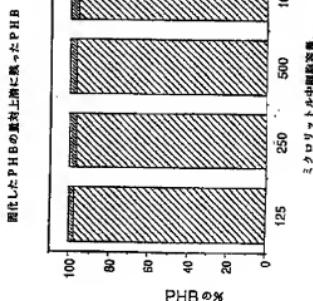


FIG. 3

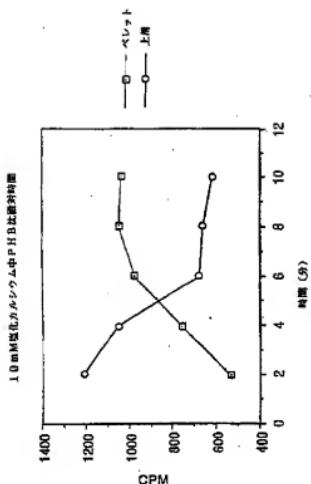


FIG. 4

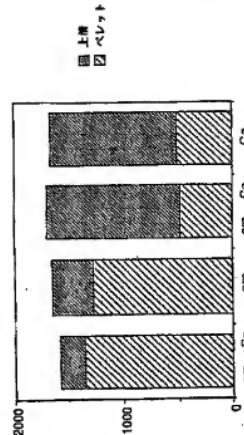


FIG. 5

方法は PHB 生合成路をコードしている遺伝子を含む形質転換されたイ-コリ<sup>14</sup>を用いて PHB の生合成を測定することを報告する。PHB をコードしている遺伝子をラクターゼ利尿系を含む宿主に導入することによりホホジニ酸を含むイ-コリ<sup>15</sup>が最も優れた PHB 生成したための微生物及び収量として用いることができる。PHB 生成能の評価法において、最初と最後の 2 回の生産のうちの最初の 0.05 の内の確率をコードするプラスミド、pA4 は、宿主に導入され、他のプラスミドも導入されると確実に大腸の PHB 製造を生むことを示した。CaCl<sub>2</sub> では形質転換されたイ-コリ<sup>16</sup>に生産した PHB を形質化するための効率的な方法であることを示した。

第1頁の統計

©Int. Cl. 8

11(C 12 P 7/62  
C 12 R 1:19)



